



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : C07K 3/20, 3/22, A61K 39/395		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/29334 (43) Date de publication internationale: 22 décembre 1994 (22.12.94)		
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00699		(81) Etats désignés: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TI, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).			
(22) Date de dépôt international: 13 juin 1994 (13.06.94)		Publiée			
(30) Données relatives à la priorité: 93/07128 14 juin 1993 (14.06.93) FR		Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.			
<p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): ASSOCIATION POUR L'ESSOR DE LA TRANSFUSION SAN-GUINE DANS LA REGION DU NORD [FR/FR]; 21, rue Camille-Guérin, F-59000 Lille (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): BURNOUF, Miryana [FR/FR]; 5, rue du Docteur-Shaffner, F-59136 Wavrin (FR). DERNIS, Dominique [FR/FR]; 59, route de Meain, F-59520 Marquette-lez-Lille (FR). BONNEEL, Patrick [FR/FR]; 25, rue Kant, F-59000 Lille (FR). BURNOUF, Thierry [FR/FR]; 5, rue du Docteur-Shaffner, F-59136 Wavrin (FR).</p> <p>(74) Mandataires: LHUILLIER, René etc.; Cabinet Lepeduy, 52, avenue Daumesnil, F-75012 Paris (FR).</p>					
<p>(54) Titre: IMMUNOGLOBULIN G CONCENTRATE FOR THERAPEUTICAL USE AND METHOD FOR PRODUCING SAME</p> <p>(54) Titre: CONCENTRE D'IMMUNOGLOBULINES G A USAGE THERAPEUTIQUE ET PROCEDE DE PRODUCTION DUDIT CONCENTRE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A plasma-derived immunoglobulin G concentrate and a method for producing same are disclosed. The method includes a series of chromatographic separations but no ethanol precipitation, and further includes viral inactivation treatment. The resulting immunoglobulin G concentrate for therapeutical use, in particular for intravenous injection, is also disclosed.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne un concentré d'immunoglobulines G d'origine plasmatique et son procédé de production. Celui-ci comprend une succession de séparations chromatographiques mais pas de précipitation à l'éthanol. Le procédé comprend, en outre, un traitement d'inactivation virale. L'invention concerne également le concentré d'immunoglobulines G obtenu par ledit procédé et dont la qualité est appropriée pour tout usage thérapeutique, en particulier pour l'injection par voie intraveineuse.</p>					

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Bresil	JP	Japan	PT	Portugal
BY	République Biélorusse	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Sabah
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

Concentré d'immunoglobulines G à usage thérapeutique et procédé de production dudit concentré.

La présente invention concerne un concentré 5 d'immunoglobulines G à usage thérapeutique et le procédé de production dudit concentré.

Diverses préparations d'immunoglobulines polyvalentes sont déjà utilisées depuis longtemps. D'une manière générale, elles sont préparées à partir d'un "pool" 10 de sérum de 2.000 à 5.000 donneurs ce qui assure la présence de tous les anticorps normalement présents dans l'ensemble de la population d'une contrée choisie.

Ces préparations d'immunoglobulines sont préparées 15 selon la méthode classique de Cohn plus ou moins modifiée, c'est-à-dire par précipitation à l'éthanol. Ce procédé présente un désavantage important dû au traitement à l'éthanol qui provoque une certaine dénaturation des protéines et la formation d'agrégats de polymères d'immunoglobulines. Ceux-ci présentent un risque 20 thérapeutique en provoquant l'activation du système complément et des réactions anaphylactiques. Ces préparations ne peuvent donc pas être utilisées en injections intraveineuses mais seulement en intra-musculaires, ce qui en limite la dose injectable et 25 l'efficacité.

Différents traitements sont déjà appliqués pour contourner ce problème : le clivage des immunoglobulines par la pepsine ou par la plasmine, un traitement à la  $\beta$ -propiolactone ou avec des agents réducteurs et alkylants, 30 ou à pH 4, ou avec du PEG pour précipiter les agrégats.

La Demanderesse a préféré éviter ces traitements enzymatiques ou chimiques et a supprimé l'étape de précipitation à l'éthanol. Elle a ainsi mis au point un procédé qui comprend une succession de séparations 35 chromatographiques et qui ne comporte aucune précipitation.

La préparation de concentrés d'immunoglobulines par chromatographie a déjà été expérimentée par Friesen et al. (Friesen - Joint IABS/CSL Symp. on Standardization in

Blood Fractionation - Australia 1986 - Develop. biol. Standard.67,1987, 3-13 ; Immunoglobulins - Pub. Central Lab.Netherlands Red Cross 1988 - Ed. Krynen, Strengers, Van Aken) qui utilisent une ou deux chromatographies d'échanges 5 d'anions :

- Une chromatographie unique sur DEAE-Sephadex permet la préparation de  $\gamma$ .globulines spécifiques à partir de serums hyperimmuns, mais elle n'est applicable qu'à de petits volumes.

10 - Une chromatographie sur DEAE-Sepharose suivie d'une chromatographie sur DEAE-Sephadex permet de préparer de plus grands volumes et est applicable à la préparation d'immunoglobulines polyvalentes, mais le procédé ne s'est pas révélé rentable à l'échelle industrielle.

15 La purification des immunoglobulines pose des problèmes particuliers, outre ceux qui ont déjà été cités plus haut, parce que leur activité biologique est liée à leur intégrité structurale, or cette activité ne se mesure pas simplement, comme une activité enzymatique. Ainsi, par 20 exemple, pour un anticorps spécifique, à taux égal en anticorps mesuré par ELISA, le pouvoir de neutralisation de l'infectivité d'un virus varie fortement d'un concentré à l'autre, en fonction du procédé de préparation.

25 La Demanderesse s'est donc attachée à mettre au point un procédé de purification des immunoglobulines non dénaturant, applicable à l'échelle industrielle (par exemple sur des lots de serum de plus de 500 litres) et qui permet, en outre, la récupération des autres protéines plasmatiques d'intérêt thérapeutique.

30 Le procédé de production d'un concentré d'immunoglobulines, selon la présente invention, ne comprend pas de précipitation à l'éthanol et comprend une succession d'étapes chromatographiques au cours desquelles les immunoglobulines restent toujours en phase liquide et à un 35 pH compris entre 5,5 et 7,8. Le procédé comprend également une étape d'inactivation virale, par exemple par traitement au solvant-détergent.

Le procédé selon la présente invention s'applique au plasma total ou, de préférence, au surnageant du cryoprécipité.

Il s'applique aussi bien à de grands volumes de 5 "pool" de plasmas destinés à la préparation d'immunoglobulines polyvalentes qu'à de plus petits volumes de plasmas hyperimmuns destinés à la préparation d'immunoglobulines spécifiques.

Le plasma ou la fraction de plasma de départ est 10 de préférence soumis à une étape de prépurification, avant la mise en oeuvre du procédé proprement dit ; celle-ci est effectuée par filtration sur une série de cartouches filtrantes de porosité de 0,5 à 0,2 $\mu$ , constituées de cellulose et de perlites, portant des charges négatives, et 15 d'une faible quantité de résine chargée positivement (filtres Zeta plus® fournis par Cuno - USA). Ces filtres, grâce à leur charge négative, permettent l'adsorption et donc ici l'élimination du Facteur XI qui, sans cette étape de prépurification se retrouve copurifié avec les 20 immunoglobulines ce qui peut entraîner une intolérance au produit final et des phénomènes d'hypotension.

Le procédé comprend éventuellement une ou 25 plusieurs étapes de prépurification qui permettent d'éliminer certaines protéines plasmatiques et ainsi de diminuer la taille des colonnes de chromatographie ultérieures, ce qui est particulièrement avantageux pour les grands volumes. Ainsi la fraction de protéines peut être 30 prépurifiée en "batch" en présence d'un gel échangeur d'anions, de type DEAE-Sephadex®, qui permet la rétention et donc l'élimination du Facteur IX, du Facteur VII, de la protéine C. Elle peut ensuite être injectée sur une colonne de gel échangeur d'anions, de type DEAE-Sepharose®, qui permet la rétention et l'élimination de l'albumine et de l' $\alpha$ .antitrypsine. Ces dernières peuvent être désorbées et 35 concentrées selon des méthodes connues, et avec un rendement particulièrement élevé grâce au procédé tel que décrit pour la présente invention.

La fraction protéique constituant le filtrat de la colonne peut éventuellement être soumise à une chromatographie sur une colonne d'héparine-Sepharose® avant 5 d'être soumise à la chromatographie suivante, afin d'éliminer l'antithrombine III.

Le procédé selon la présente invention comprend une étape de dessalage, soit par ultrafiltration, soit par chromatographie de tamisage moléculaire, dans laquelle le 10 filtrat des étapes de prépurification éventuelles est injecté sur une colonne de gel de type dextran réticulé, par exemple du Sephadex®-G25, équilibré en tampon Tris-HCl 0,022M à pH 7,8 et la fraction contenant les protéines plasmatiques est récupérée.

15 La dite fraction protéique est ensuite injectée sur une colonne de chromatographie constituée d'un gel échangeur d'anions, plus particulièrement d'un gel greffé de groupements DEAE. On obtient un rendement particulièrement efficace avec un gel de type acrylamide réticulé comme le 20 DEAE-Trisacryl® Plus LS (Sepracor-IBF, réf. 262080), équilibré en tampon Tris-HCl 0,025M à pH 7,8. Cette colonne adsorbe pratiquement toutes les protéines plasmatiques sauf les immunoglobulines G. Ces dernières se retrouvent dans le filtrat et peuvent être concentrées à environ 50 g/l.

25 La solution concentrée d'immunoglobulines est ensuite soumise à un traitement d'inactivation virale, par exemple, par un traitement en présence de solvant-détergent et de préférence de TnBP (tri(n-butyl)phosphate) 0,3 % et de Tween®80 (polyoxyethylenesorbitane-monooléate) 1 %, à 25°C 30 sous légère agitation pendant au moins 6 heures.

Le procédé selon la présente invention comprend ensuite une chromatographie sur gel échangeur de cations, plus particulièrement sur un gel greffé de groupements carboxyméthyle (CM). On obtient un rendement particulièrement 35 efficace avec un gel de type CM-Trisacryl® LS (Sepracor, réf. 260280) équilibré en tampon acétate de sodium 0,024M à pH 5,5.

Ce gel adsorbe les immunoglobulines et permet l'élimination du solvant-détergent dans le filtrat. Les immunoglobulines sont ensuite désorbées et éluées par augmentation de la force ionique du tampon à 0,15 - 5 0,19 M NaCl.

Elles sont additionnées de saccharose à 110g/l, conditionnées et lyophilisées.

L'analyse du concentré d'immunoglobulines G obtenu par le procédé décrit plus haut confirme qu'il est dépourvu 10 d'agrégats et d'immunoglobulines A et, de manière surprenante, qu'il est également dépourvu d'immunoglobulines E ou qu'il n'en contient plus qu'un taux inférieur à 10 % du taux présent dans le plasma, ce qui lui confère un avantage thérapeutique supplémentaire.

15 La présente invention concerne donc un nouveau concentré d'immunoglobuline G d'origine plasmatique dépourvu d'agrégats d'immunoglobulines G et d'immunoglobulines E, ainsi que d'IgA.

Ces propriétés le rendent donc particulièrement 20 adapté à une injection par voie intraveineuse et il est formulé de manière appropriée en vue de ladite injection.

Les exemples suivants décrivent des modes de mise en oeuvre du procédé sans toutefois limiter la portée de 25 l'invention.

#### 25 Exemple 1

Le matériau de départ est un pool de 500 litres de plasma de donneurs sains, choisis au hasard dans une population normale.

30 Après cryoprécipitation selon les méthodes classiques, le surnageant est récupéré pour être soumis aux différentes étapes de chromatographie

##### 1. A Chromatographie de dessalage.

Cette chromatographie est effectuée sur une colonne GF 04-06 (Sepracor®) de 65 litres de Sephadex® G25 35 équilibrée en tampon Tris HCl 0,022M à pH 7,8, à un débit de 450 litres/heure.

Le filtrat est suivi par densitométrie et la fraction contenant l'ensemble des protéines est récupérée.

La colonne est régénérée par lavage avec une solution de NaCl 1M.

#### 1.B Chromatographie sur gel échangeur d'anions.

Cette chromatographie est effectuée sur des 5 colonnes GF 08015 de 65 litres de DEAE-Trisacryl® équilibrées en tampon Tris-HCl 0,025M à pH 7,8, à un débit de 150 litres/heure.

Dans ces conditions d'utilisation, les 10 immunoglobulines G sont pratiquement les seules protéines qui ne s'adsorbent pas sur la colonne.

Le filtrat est suivi par densitométrie et la fraction protéique est récupérée. Elle est donc constituée à près de 100 % d'immunoglobulines G.

L'albumine qui est restée adsorbée sur la colonne 15 est éluée par addition de NaCl 0,4M dans le tampon et elle est concentrée selon des méthodes classiques.

La colonne est régénérée par lavage avec une solution de NaCl 2M.

#### 1.C Traitement d'inactivation virale.

20 Le filtrat de la colonne précédente est concentré à environ 50g/l et soumis à un traitement classique par addition d'un mélange de solvant-détergent, pendant 6 heures à 25°C sous agitation lente.

Le mélange comprend du TnBP 0,3 % et du Tween 80 1 %.

#### 1.D. Chromatographie sur gel échangeur de cations.

Cette chromatographie est effectuée sur une colonne GF 08015 de 65 litres de CM-Trisacryl® équilibrée en tampon acétate de sodium 0,024M à pH 5,5, à un débit de 20 à 100 litres/heure.

30 Dans ces conditions d'utilisation les immunoglobulines s'adsorbent sur le gel et la combinaison solvant-détergent et les éventuels contaminants dénaturés ou autres résidus sont éliminés dans le filtrat.

Les immunoglobulines sont ensuite désorbées par 35 augmentation de la force ionique du tampon par addition de chlorure de sodium 0,15 à 019M

La fraction d'immunoglobulines récupérée a une concentration de 30 à 50g/l et peut donc être conditionnée

telle quelle, après addition de saccharose à 110g/l.

La colonne est régénérée par lavage avec une solution de NaCl 1M.

Exemple 2

5 Au procédé décrit dans l'exemple 1 on ajoute une étape préliminaire de prépurification, avant la première chromatographie.

Le surnageant du cryoprécipité est soumis à une filtration sur une batterie de 3 cartouches de filtres de 10 porosité comprise entre 0,5 et 0,2  $\mu$  et essentiellement chargés négativement (Filtres Zeta plus  $^{\circledR}$ , fournis par Cuno, Process Filtration Products, filiales de Commercial Intertech Corp. USA, et décrit dans les brevets US 4,783,262 et 4,859,340, dénommés "filtres Cuno"). Ces filtres sont 15 constitués de cellulose purifiée, de perlites et d'une faible quantité de résine chargée positivement. D'autres systèmes de filtres disponibles dans le commerce peuvent également être utilisés.

Les filtres sont rincés en tampon 20 citrate/phosphate comprenant du citrate de sodium, du phosphate disodique, du phosphate de potassium, du chlorure de sodium et de l'EDTA-disodique et ajusté à un pH compris entre 5,5 et 6,5 et, préférentiellement, à pH 6.

Cette étape de filtration permet la rétention et 25 donc l'élimination du Facteur XI.

Exemple 3

Au procédé décrit dans l'exemple 1 ou dans 30 l'exemple 2 on ajoute une étape préalable d'adsorption sur gel échangeur d'anions, avant la première chromatographie de dessalage sur Sephadex G25.

Cette adsorption préalable est effectuée en "batch" en présence de DEAE-Sephadex $^{\circledR}$  à une concentration de 1,5g/litre de plasma, durant 2 à 5 heures. Ceci permet la rétention et donc l'élimination du Facteur IX, du Facteur 35 VII et de la protéine C. Les immunoglobulines se retrouvent dans le surnageant.

Celui-ci peut encore être soumis à une prépurification supplémentaire par chromatographie sur

colonne de DEAE-Sepharose® CL6B fast flow (Pharmacia). Le matériel plasmatique est dialysé et ajusté à une conductivité de 1,6 mS avec de l'acétate de sodium 0,025M. Le pH est ajusté à 7,6.

5 La colonne est équilibrée en tampon acétate de sodium 0,025M à pH 7,6.

Les immunoglobulines se retrouvent dans le filtrat.

Ce procédé a le double avantage :

10 - de laisser filtrer des immunoglobulines déjà prépurifiées et ainsi de permettre une réduction de la taille des colonnes chromatographiques suivantes.

- et de retenir l'albumine et l' $\alpha$  antitrypsine qui peuvent ensuite être purifiées, selon des méthodes connues 15 avec un rendement particulièrement élevé.

Le filtrat contenant les immunoglobulines G prépurifiées peut encore être soumis à une chromatographie sur colonne d'héparine-Sepharose® équilibrée en tampon phosphate 0,02 M -chlorure de sodium 0,154M à pH 6,8.

20 Cette chromatographie permet d'adsorber et donc d'éliminer l'antithrombine III alors que les immunoglobulines G se retrouvent dans le filtrat.

Exemple 4

On a comparé les titres en anticorps mesurés par 25 ELISA et le pouvoir neutralisant de l'infectivité d'un virus choisi comme modèle, le cytomegalovirus, avec les immunoglobulines préparées selon les méthodes classiques de fractionnement par l'éthanol suivi d'un traitement à pH4 en présence de pepsine et selon le procédé de la présente 30 invention.

Mode de préparation des IgG	Titre ELISA (U/ml)	Pouvoir neutralisant (titre du CMV)
• Méthode traditionnelle		
lot 1	100	1280
lot 2	110	640
lot 3	110	640
• Selon la présente invention		
lot 1	90	2560
lot 2	120	5120
lot 3	100	5120

5            Ces résultats indiquent clairement que, pour une quantité équivalente d'anticorps (en ELISA) la qualité de ceux-ci, évaluée par leur activité biologique (pouvoir neutralisant) est nettement supérieure pour les anticorps produits par voie chromatographique.

10

Exemple 5

On a mesuré la quantité d'IgE présente dans le plasma de départ, dans des lots de concentré d'IgG préparés selon la méthode classique (comme rappelé dans l'exemple 4) et par la méthode chromatographique selon la présente invention.

15           Le tableau suivant montre qu'il ne subsiste presque pas d'IgE dans la préparation par chromatographie alors qu'elles sont plus concentrées que dans le plasma de départ dans les préparations classiques.

20

	N°. de lot	IgE (UI/ml)
PLASMA DEPART	99030120 30162 30170	96 108 118
IgG "classiques"	50020200 20231 20291 23300 30070 30071 30072 30080 30081 30082 30090 30091 30092 30100 30101 30102 30110 30112 30120 30121 30122 30130 30131 30132	293 259 272 220 230 210 246 242 258 248 214 212 170 160 117 144 250 224 195 161 220 238 248 227
IgG préparées par chromatographie	50230050 070 080 090 100 110	12 6 8,1 4,1 7,5 3,5

## REVENDICATIONS

1. Concentré d'immunoglobulines G d'origine plasmatique à usage thérapeutique, caractérisé en ce qu'il 5 est dépourvu d'agrégats d'immunoglobulines G et qu'il ne contient qu'un taux d'immunoglobulines E inférieur à 10 % du taux présent dans le plasma.

2. Procédé de production d'un concentré d'immunoglobulines G selon la revendication 1, caractérisé 10 en ce qu'il ne comprend pas de précipitation à l'éthanol et qu'il comprend une succession d'étapes de chromatographie au cours desquelles les immunoglobulines restent toujours en phase liquide et à un pH compris entre 5,5 et 7,8, ainsi qu'une étape d'inactivation virale.

15 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend successivement :

- a- une étape de dessalage,
- b- une chromatographie sur gel échangeur d'anions,
- c- un traitement d'inactivation virale,
- 20 d- et une chromatographie sur gel échangeur de cations.

4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que le matériau de départ est la fraction du plasma surnageant après cryoprecipitation.

25 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le surnageant de la cryoprecipitation est soumis à une étape de prépurification par filtration sur une série de cartouches de filtres de porosité de 0,5 à 0,2  $\mu$ , constitués de cellulose et de perlites, portant des charges négatives, 30 et d'une faible quantité de résine chargée positivement.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend une ou plusieurs étapes de prépurification par adsorption de certaines protéines plasmatiques sur des gels choisis parmi 35 les gels échangeurs d'anions et l'héparine-sepharose.

7. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'étape a) est réalisée sur un gel de type dextran réticulé, équilibré en tampon Tris-HCl 0,022M à pH 7,8 et

que la fraction comprenant les protéines plasmatiques est récupérée pour être soumise à l'étape b).

8. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'étape b) est réalisée sur un gel de type 5 acrylamide réticulé, greffé avec des groupements DEAE, équilibré en tampon Tris-HCl 0,025M à pH 7,8 et que le filtrat est récupéré pour être soumis à l'étape c).

9. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'étape c) est réalisée par traitement au solvant-10 détergent pendant au moins 6 heures à 25°C.

10. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'étape d) est réalisée sur un gel de type acrylamide réticulé, greffé avec des groupements carboxyméthyle, équilibré en tampon acétate de sodium 0,024M 15 à pH 5,5, et que les immunoglobulines adsorbées sur le gel sont éluées par augmentation de la force ionique du tampon à 0,15 - 0,19M NaCl

11. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les immunoglobulines éluées de l'étape d) sont 20 additionnées de saccharose à 110g/l puis lyophilisées.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 5 C07K3/20 C07K3/22 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE,A,32 08 523 (LABORATORIOS LANDERLAN,S.A.) 5 May 1983	1
Y	see claim 1; examples 1,2 -----	11
X	DE,C,41 18 912 (BIOTEST PHARMA GMBH) 2 July 1992	1,2
Y	see the whole document -----	3-11
X	EP,A,0 440 483 (BAXTER INTERNATIONAL INC.) 7 August 1991	1,2
Y	see the whole document -----	3-11
X	US,A,4 806 346 (HUM ET AL) 21 February 1989	1
Y	see the whole document -----	3,6-11
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*B\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but referred to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 September 1994

Date of mailing of the international search report

18.10.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlan 2  
 22852 FV/Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,89 05157 (INVITRON CORPORATION) 15 June 1989 see claims 1-10; example 4	1
X	EP,A,0 268 973 (BIOTEST PHARMA GMBH) 1 June 1988	1
Y	see page 3, line 21 - page 4, line 10	4-6
Y	DE,A,26 41 840 (LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT VZW) 7 April 1977 see example 2	6
X	US,A,4 841 024 (NATHANS ET AL) 20 June 1989	1
Y	see column 1, line 4 - column 2, line 51	3,6-11
X	EP,A,0 270 025 (SCHWAB & CO. GES.M.B.H.) 8 June 1988	1
Y	see page 2, line 1 - page 4, line 10	11
A	US,A,4 136 094 (CONDIE) 23 January 1979	-----
A	EP,A,0 121 468 (RHONE-POULENC RECHERCHES) 10 October 1984	-----

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE-A-3208523	05-05-83	JP-A-	57206625	18-12-82
DE-C-4118912	02-07-92	EP-A-	0530447	10-03-93
EP-A-0440483	07-08-91	US-A- JP-A-	5177194 6136000	05-01-93 17-05-94
US-A-4806346	21-02-89	NONE		
WO-A-8905157	15-06-89	US-A- AU-A-	5118796 2819289	02-06-92 05-07-89
EP-A-0268973	01-06-88	DE-A- JP-A- US-A-	3640513 63145237 4877866	09-06-88 17-06-88 31-10-89
DE-A-2641840	07-04-77	NL-A- BE-A- CA-A- FR-A, B GB-A- JP-A- SE-A- US-A-	7511055 846155 1095406 2326705 1525143 52041222 7610302 4216291	22-03-77 14-03-77 10-02-81 29-04-77 20-09-78 30-03-77 20-03-77 05-08-80
US-A-4841024	20-06-89	NONE		
EP-A-0270025	08-06-88	DE-A- DE-A- US-A-	3641115 3783879 4880913	16-06-88 11-03-93 14-11-89
US-A-4136094	23-01-79	US-A-	4296027	20-10-81
EP-A-0121468	10-10-84	FR-A- AU-B- AU-A- CA-A- DE-A- JP-B- JP-A-	2543448 565104 2626484 1203478 3469132 5020439 60023320	05-10-84 03-09-87 04-10-84 22-04-86 10-03-88 19-03-93 05-02-85

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0121468	US-A-	4675384	23-06-87

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 5 C07K3/20 C07K3/22 A61K39/395

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vues
X	DE,A,32 08 523 (LABORATORIOS LANDERLAN,S.A.) 5 Mai 1983 voir revendication 1; exemples 1,2 ---	1
Y	DE,C,41 18 912 (BIOTEST PHARMA GMBH) 2 Juillet 1992 voir le document en entier ---	11
X	DE,A,0 440 483 (BAXTER INTERNATIONAL INC.) 7 Août 1991 voir le document en entier ---	1,2
Y	US,A,4 806 346 (HUM ET AL) 21 Février 1989 voir le document en entier ---	3-11
X	WO,A,89 05157 (INVITRON CORPORATION) 15 Juin 1989 voir revendications 1-10; exemple 4 ---	1
Y	---	3,6-11



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"B" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou à toutes autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant à la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventrice par rapport au document considéré seulement

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventrice par rapport au document considéré, mais l'invention revendiquée est étroitement liée à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 Septembre 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18. 10. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tl. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
X	EP,A,0 268 973 (BIOTEST PHARMA GMBH) 1 Juin 1988	1
Y	voir page 3, ligne 21 - page 4, ligne 10 -----	4-6
Y	DE,A,26 41 840 (LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT VZW) 7 Avril 1977 voir exemple 2 -----	6
X	US,A,4 841 024 (NATHANS ET AL) 20 Juin 1989	1
Y	voir colonne 1, ligne 4 - colonne 2, ligne 51 -----	3,6-11
X	EP,A,0 270 025 (SCHWAB & CO. GES.M.B.H.) 8 Juin 1988	1
Y	voir page 2, ligne 1 - page 4, ligne 10 -----	11
A	US,A,4 136 094 (CONDIE) 23 Janvier 1979 -----	
A	EP,A,0 121 468 (RHONE-POULENC RECHERCHES) 10 Octobre 1984 -----	

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
DE-A-3208523	05-05-83	JP-A-	57206625	18-12-82
DE-C-4118912	02-07-92	EP-A-	0530447	10-03-93
EP-A-0440483	07-08-91	US-A- JP-A-	5177194 6136000	05-01-93 17-05-94
US-A-4806346	21-02-89	AUCUN		
WO-A-8905157	15-06-89	US-A- AU-A-	5118796 2819289	02-06-92 05-07-89
EP-A-0268973	01-06-88	DE-A- JP-A- US-A-	3640513 63145237 4877866	09-06-88 17-06-88 31-10-89
DE-A-2641840	07-04-77	NL-A- BE-A- CA-A- FR-A, B GB-A- JP-A- SE-A- US-A-	7511055 846155 1095406 2326705 1525143 52041222 7610302 4216291	22-03-77 14-03-77 10-02-81 29-04-77 20-09-78 30-03-77 20-03-77 05-08-80
US-A-4841024	20-06-89	AUCUN		
EP-A-0270025	08-06-88	DE-A- DE-A- US-A-	3641115 3783879 4880913	16-06-88 11-03-93 14-11-89
US-A-4136094	23-01-79	US-A-	4296027	20-10-81
EP-A-0121468	10-10-84	FR-A- AU-B- AU-A- CA-A- DE-A- JP-B- JP-A-	2543448 565104 2626484 1203478 3469132 5020439 60023320	05-10-84 03-09-87 04-10-84 22-04-86 10-03-88 19-03-93 05-02-85

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0121468	US-A-	4675384	23-06-87